

Scopolamine으로 유도된 기억력 손상 동물모델에서 비파엽 추출물의 학습 및 기억력 개선 효과

배동혁^{1,2} · 김지혜¹ · 나주련^{1,2} · 김유진¹ · 이준열³ · 김선오^{1*}

¹전라남도 천연자원연구원

²전남대학교 식품영양학과

³한국인스팜(주) 중앙연구소

Anti-amnesic Effect of *Eriobotrya japonica* Leaf Extract on Scopolamine-induced Memory Impairment in Rats

Donghyuck Bae^{1,2}, Jihye Kim¹, Ju-Ryun Na^{1,2}, Yujin Kim¹, Joon-Yeol Lee³, and Sunoh Kim^{1*}

¹Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jeonnam 529-851, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Korea INS Pharm Research Institute, Jeonnam 519-882, Korea

ABSTRACT The present study was conducted to evaluate the effects of extract from *Eriobotrya japonica* leaves (EJE) on cognitive impairment induced by scopolamine, a muscarinic antagonist, in rats. Scopolamine injection (1 mg/kg, i.p.) impaired performance in rats in the passive avoidance test as well as in water maze test and severely reduced cholinergic system reactivity, as indicated by reduced acetylcholine levels and increased acetylcholinesterase activity. Daily administration of EJE significantly increased step-through latency in the passive avoidance test, reduced escape latency, and increased time spent in the platform quadrant in the Morris water maze test. EJE protected against scopolamine-induced cholinergic system deficit, including reduced acetylcholine levels and increased acetylcholinesterase activity in whole brain homogenates. These results suggest that EJE provides a significant anti-amnesic effect against scopolamine-induced cholinergic system deficits and cognitive impairment.

Key words: anti-amnesia, scopolamine, cognitive impairment, *Eriobotrya japonica*

서 론

치매(dementia)는 다양한 요인에 의해 발생하는 학습과 기억력이 감퇴되는 질환으로서 그중 Alzheimer's disease (AD)는 연령과 연관된 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 치매의 가장 흔한 형태로 알려져 있다(1). 이러한 AD는 임상적으로 인지능력 장애, 언어능력과 운동협응능력 그리고 행동의 변화를 야기하며, 신경 병리학적 특징으로는 세포외 amyloid- β peptide(A β)로 이루어진 extracellular senile plaques, 세포내로는 neurofibrillary tangle이 동반된 신경 세포들 및 시냅스의 광범위한 손실, 신경전달물질계의 변형 등을 들 수 있다(2). 특히 전뇌기저부(basal forebrain)에서의 cholinergic cell들의 손실은 acetylcholine(Ach)과 같은 신경전달물질의 소실을 야기하며(3), 치매의 진행에 있어 결정적인 요인으로 작용한다(4). 현대 의학계에서도 cholinergic hypothesis를 기본으로 acetylcholinesterase(AchE) in-

hibitor를 이용하여 brain cholinergic activity를 증가시키려는 많은 시도가 진행 중에 있으며, cholinergic synapses에서 Ach의 함량을 증가시키는 역할을 하는 AchE 활성 억제제의 투여는 AD 증상 치료를 목적으로 하는 신약 개발에 있어 주요 전략 중 하나이다(5).

Muscarinic cholinergic receptor의 길항제(antagonist)인 scopolamine은 실험동물 모델에 있어 기억력 감퇴(건망증) 및 인지능력 저하에 대한 연구 분야에서 널리 사용되는 물질이다. 실제로 rat을 이용한 실험동물 모델에서 scopolamine을 복강투여 하게 되면, cholinergic neurotransmission들의 기능이 봉쇄되고 cholinergic dysfunction과 인지능력의 저하가 보이는 것을 확인하였으며(6), 사람을 상대로 하는 임상 결과에서 또한 scopolamine에 의한 기억력 및 인지능력의 저하를 확인하였다(7,8). 따라서 본 연구는 이러한 데이터를 바탕으로 기억력 개선 소재를 탐색하기 위한 동물 모델로 scopolamine으로 유도한 기억력 및 인지능력 손상 rat 모델을 사용하였다.

비파(*Eriobotrya japonica*, 또는 영문명 'loquat')는 동아시아에서 기침이나 소화기계 질병을 치료하기 위한 전통 약제로 널리 사용되어 왔으며(9,10) 특히 염증과 종양(tumors)

Received 11 February 2014; Accepted 28 February 2014

*Corresponding author.

E-mail: sunoh@korea.ac.kr, Phone: +82-61-860-2610

에 효과적인 치료제로 알려져 있다(11,12). 비파엽에서 알려진 일반적인 활성 성분으로는 triterpenes, flavonoids, tannins 및 megastigmane glycosides 등이 알려졌으며, 이러한 성분들은 항염증, 항산화, 항돌연변이화 또는 항종양 효과와 같은 활성들을 보인다고 보고되었다(13-15).

본 연구진은 과거 선행 연구로서 실험동물에 A β 로 유도한 AD 모델에서 비파엽 추출물의 신경세포 손상 보호 효과를 보고하였다(16). 따라서 본 연구는 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 동물모델에서 비파엽 추출물의 추가적인 잠재적 활성 및 효과를 평가하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 제조

비파엽추출물(EJE)은 한국인스팜 중앙연구소(Hwasun, Korea)으로부터 공급받아 사용하였다. 비파엽은 대한민국 전라남도 장흥에서 채취하였으며, 비파엽을 5% 에탄올을 이용하여 100°C에서 4시간 환류 추출하였다. 그리고 얻어진 추출물을 필터 후 감압농축하고 분무건조를 실시하여 최종 추출물을 얻었다. 본 실험에 사용한 시약으로 scopolamine, acetylcholine, hydroxylamine 및 dithionitrobenzoic acid의 경우 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 사용된 시약은 first grade 이상 등급을 사용하였다.

실험동물

6주령의 SD-rat(male)을 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후 이상이 없는 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 본 시험의 환경은 온도(22±3°C), 상대습도(50±20%), 환기횟수(10~15회/시간), 조명주기 12시간(8:00~20:00), 조도(150~300 Lux)의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하였으며 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군 분리를 실시하였다. 본 동물실험은 실험동물윤리위원회(천연자원연구원)의 승인(승인번호: 21~26)을 받아 수행하였다.

군분리 및 시료처리

시험군은 총 5개의 군으로 분리하였다: i) control군(vehicle-injection+saline administration group), ii) scopolamine 처리군(scopolamine-injection+saline administration group), iii) donepezil 처리군(scopolamine-injection+1 mg/kg b.w. donepezil administration group), iv) EJE 50 mg/kg 처리군(scopolamine-injection+50 mg/kg b.w. EJE administration group), v) EJE 200 mg/kg

kg 처리군(scopolamine-injection+200 mg/kg b.w. EJE administration group). 양성대조군으로는 donepezil(1 mg/kg b.w.)을 처리하였으며, 15일간 24시간 간격으로 EJE를 50, 200 mg/kg b.w. 농도로 전처리(경구투여) 하였다. 16일째에 농도별로 EJE 및 양성대조군으로서 donepezil을 투여하고 2시간 후 scopolamine을 복강투여(1 mg/kg b.w.) 하였으며 scopolamine을 투여한지 30분 후에 water maze test 및 행동평가를 실시하였다. 이와 같은 방식으로 총 5일간 행동평가를 수행하였으며, 5일간의 행동평가 후 해부를 통해 acetylcholine 함량과 acetylcholinesterase를 측정하였다.

Water maze test

Water maze test는 Morris 실험법을 수정 보완한 것으로(17), 원형풀(diameter: 180 cm, height: 75 cm)에 물을 25±1 cm로 채우고, 탈출 platform(24 cm)을 수면 1 cm 아래에 숨겼다. 위치를 확인할 수 있게 벽의 4면에 공간단서를 설치하고, 탈지분유를 물에 풀어 도피대를 육안으로 확인할 수 없게 하였다. 실험 2일 전과 하루 전에 모든 실험군을 도피대가 없는 swimming pool에서 1분간 자유롭게 수영하게 해 수영하는 상황에 적응시켰다. 본 실험에 들어가 도피대가 놓인 사분면을 제외한 3곳 중 2곳에서 임의의 순서로 동물을 출발시켜 60초간 도피대를 찾으려 하였다. 도피대를 찾으면 그로부터 20초간 그 위에 머무르게 하고, 45초 안에 도피대를 찾지 못하면 실험자가 손으로 동물을 도피대까지 유도하여 20초간 머물도록 하였다. 20초간의 위치 학습이 끝나면 바로 임의의 분면에서 동물을 출발시켜 도피대까지 찾아가는 시간과 이동거리를 측정하였다. 도피대를 찾아 올라가면 20초의 시간을 주고 연속적으로 하루에 총 4번, 4일 동안 시행하였다. 모든 데이터는 pool 위에 설치된 카메라로 촬영되어 video tracking system(Panlab, Barcelona, Spain)으로 분석하였다. 4일간의 실험이 끝나면 24시간 후인 5일째에 probe trial을 시행하였다. 도피대 없이 90초 동안 자유 수영을 하게 하여 이전 도피대의 위치에 대한 기억을 보유하고 있는지에 대한 검사를 실시하였다.

Passive avoidance test

밝은 불빛이 드는 chamber와 암소의 chamber가 작은 통로로 붙어있는 shuttle box에서 밝은 불빛이 드는 chamber에 실험동물을 놓아두면 실험동물은 본능적으로 어두운 암소의 chamber로 들어가게 되며, 그때 electric shock(75 V, 0.5 mA, 50 Hz)를 이용하여 혐오자극을 주어 공포학습을 시킨다(18). 8시간 후 밝은 빛의 chamber에 실험동물을 두었을 때 어두운 암소의 chamber에 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 이를 수치화하였다.

Rotarod test

균형감각과 운동협응력을 측정하기 위해 rotarod test

(five-lane accelerating rotarod; Jeung DO Bio & Plant, Seoul, Korea)를 실시하였다. 실험 전날 1분간 2회 회전하는 원통(diameter, 8 cm; rotation speed, 20 rpm) 위에 강제로 걸게 하여 적응훈련을 시킨다. 24시간 후 동일한 조건의 회전하는 원통 위에서 균형을 잃고 떨어지는 시간을 측정하였다.

Vertical pole test

Vertical pole test는 Ogawa 등(19)의 실험을 변형한 것으로 grip strength와 균형감각을 측정하기 위해 기울어진 봉 위에서 수행하였다. 45° 각도의 봉 중심부에 실험동물을 올려놓은 후 균형을 잃고 떨어질 때까지의 시간을 측정하였다. 2일 동안 1일에 1회 적응훈련을 시킨 후 3일째에 총 3회 측정하였다.

Assays of Ach cotents and AchE activity

각 처리군의 뇌 해마조직에서 acetylcholine의 측정은 Vincent 등(20)의 alkaline hydroxylamine을 가진 *o*-acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다. 96-well plate에 해마 조직 균질물 50 μ L를 취하여 1% hydroxylamine(Sigma-Aldrich Co.) 50 μ L를 첨가, 혼합한 후 HCl을 이용하여 pH를 1.2 \pm 0.2로 조절하여 FeCl₃(10% in 0.1 N HCl)을 500 μ L 첨가한 후 혼합하고 530 nm에서 흡광도를 측정하여 acetylchoine의 활성(ng/mg protein)을 측정하였다. 해마 조직의 acetylcholinesterase의 측정은 Ellman 등(21)의 방법으로, 96-well plate에 0.1 M Tris buffer, pH 8.0 (Trizma HCl+ Trizma base)을 300 μ L, 0.01 M dithionitrobenzoic acid(DTNB; Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L, 해마 조직 균질물 10 μ L를 연속적으로 첨가하고 흡광도 측정 직전에 기질인 0.1 M acetylthiocholine chloride(Sigma-Aldrich Co.) 10 μ L를 첨가하여 405 nm에서 흡광도 변화를 5분 동안 관찰하였다.

통계처리

실험의 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 각 그룹 간 차이는 Student's t-test 분석법을 사용하여 통계학적인 유의성을 판정하였으며 *P* 값이 0.05 미만(*P*<0.05)인 경우를 통계학적으로 유의하다고 보았다.

결과 및 고찰

Scopolamine으로 유도된 기억력 및 인지기능 감퇴에 대한 비파엽 추출물의 기억력 개선 효과

본 연구는 scopolamine으로 유도된 기억력 및 인지기능 감퇴에 대한 EJE의 기억력 개선 효과를 측정하기 위해 Morris water maze test를 수행하였다(Fig. 1). Fig. 1A는 water maze test의 반복일정으로서 총 4일 동안의 실험 중 학습이 진행되어 군간 가장 큰 차이를 나타내는 마지막 4일

째의 trial을 표시하였다. 정상군인 control군과 비교하였을 때, 음성대조군인 scopolamine 그룹의 도피대를 찾아 올라가는 탈출시간이 감소하지 않았으며, 총 4일 동안의 반복 학습에도 불구하고 scopolamine에 의한 기억력 장애로 학습이 진행되지 않았음을 확인할 수 있었다. 하지만 EJE 50, 200 mg/kg 처리군과 양성대조군인 donepezil 처리군은 음성대조군인 scopolamine군과 비교하여 탈출시간이 감소한 것을 확인하였다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이, 4일째에 첫 번째 trial의 경우 EJE 50 mg/kg군(55.27 \pm 16.49 sec)과 EJE 200 mg/kg군(52.01 \pm 15.33 sec)의 탈출시간은 scopolamine군과 비교하였을 때 유의적으로 감소하였으며, 4일째 마지막 trial의 경우에서도 EJE를 투여한 군들의 탈출시간은 scopolamine군과 비교하여 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 앞서 water maze test와 연결하여 5일째에 도피대를 제거하고 도피대가 존재했던 분면에서의 수영시간을 측정한 probe test를 수행하였으며, control군(55.34 \pm 3.89 sec)과 비교하여 scopolamine(22.31 \pm 5.84 sec)군의 target 분면에서의 수영시간이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2). 이는 음성대조군인 scopolamine군의 경우 scopolamine의 투여로 기억력 장애와 건망증의 유발로 정상적인 학습이 진행되지 않았으며, 이로 인해 도피대가 있었던 분면을 기억하는데 장애가 있었음을 확인할 수 있었다. 이러한 조건에서 EJE 50 mg/kg 처리군(33.15 \pm 4.28 sec)과 200 mg/kg 처리군(38.42 \pm 4.91 sec)의 경우 scopolamine군과 비교하여 유의적으로 target 분면에서의 수영시간이 증가한 것을 확인하였으며, 이와 같은 결과들로 EJE의 투여로 scopolamine에 의한 기억력 및 학습장애가 개선된 것을 확인할 수 있었다.

마찬가지로 기억력 및 뇌기능 평가를 위한 passive avoidance test에서도 음성대조군인 scopolamine군(113.39 \pm 20.28 sec)의 경우 정상군인 control군(268.69 \pm 10.97 sec)과 비교하여 공포자극에 대한 학습과 기억력이 감퇴하여 밝은 공간에서 머무는 시간이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 하지만 EJE를 투여한 EJE 200 mg/kg 처리군의 경우 밝은 공간에서 머무는 시간이 scopolamine군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

Water maze test는 주로 해마 의존성 학습능력을 측정하기 위해 수행되어지며(22-24), passive avoidance test의 경우 주로 장기 기억력을 측정하기 위해 수행되어진다(25). 본 실험에서 scopolamine으로 유발된 기억력 및 인지기능 감퇴에 대한 EJE의 효과를 확인하기 위해 수행하였던 water maze test와 passive avoidance test에서 연구진은 scopolamine에 의한 기억력 감퇴와 학습능력에 장애를 재차 확인하였으며, 반면 EJE를 투여함으로써 기억력 개선과 학습능력을 회복하는 효과가 있음을 실험 결과를 통해 확인할 수 있었다.

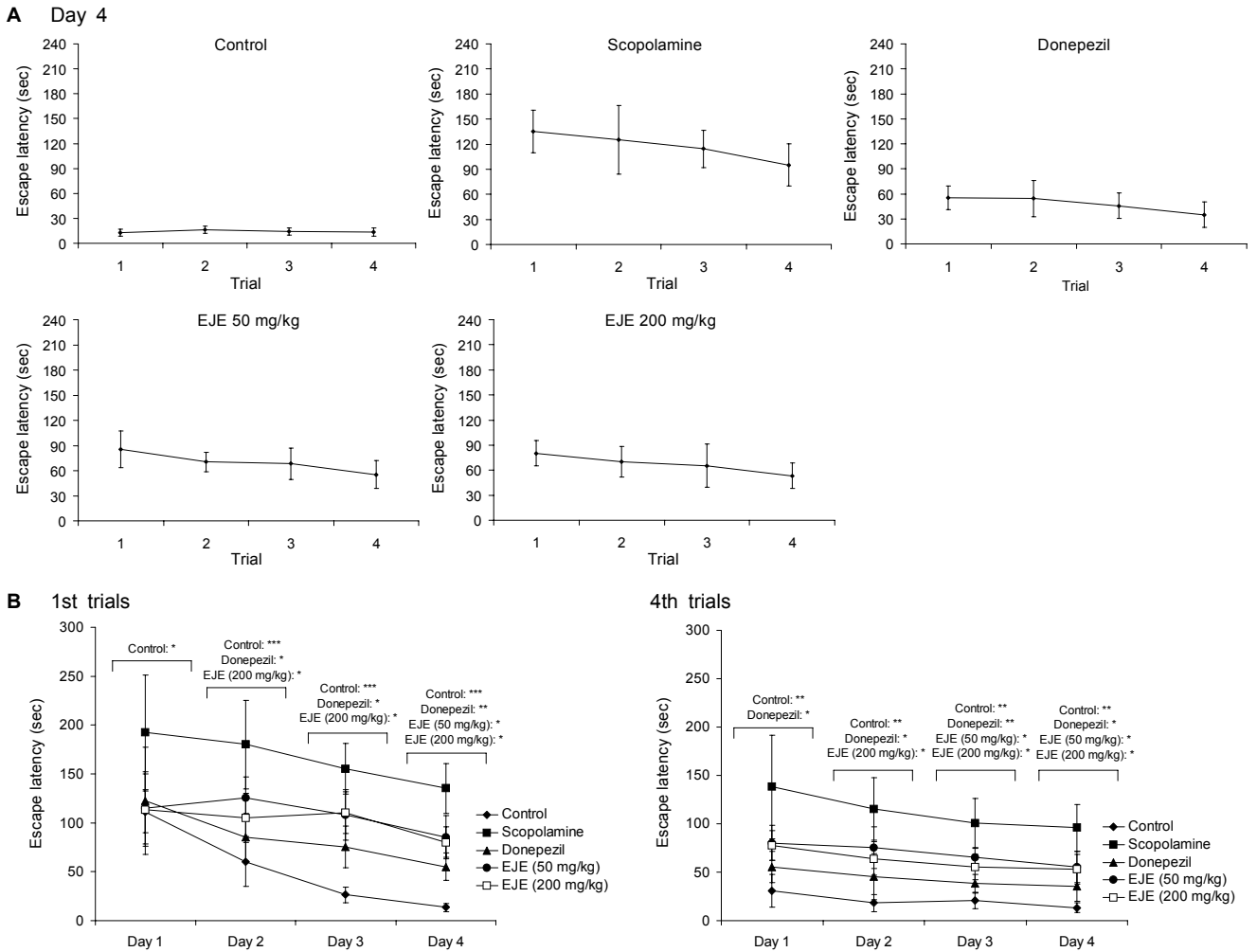


Fig. 1. Effects of *E. japonica* extract (EJE) on scopolamine-induced impairment of memory acquisition and retention in the Morris water maze test. (A) The effects of EJE on scopolamine-impaired memory in rats on the fourth day of Morris water maze testing. (B) The effects of EJE on scopolamine-impaired memory in rats on the first and fourth trials of the Morris water maze test over 4 days. Data are expressed as the mean±SD (n=7). ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, significantly different from the scopolamine group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test. Scopolamin, scopolamine-injection group; Donepezil, scopolamine-injection plus donepezil-administered group; 50 mg/kg, scopolamine-injection plus 50 mg/kg b.w. of EJE-administered group; 200 mg/kg, scopolamine-injection plus 200 mg/kg b.w. of EJE-administered group.

Scopolamine으로 유도된 운동능력 저하에 대한 비파열 추출물의 개선 효과

Scopolamine에 의한 운동능력 및 행동장애에 대한 EJE의 효과를 확인하기 위하여 rotarod test와 vertical pole test를 수행하였다(Fig. 4). Rotarod test에서 scopolamine군(54.01±5.15 sec)의 경우, 회전하는 원통 위에서 균형을 잃고 바닥으로 떨어지는 시간이 control군(65.37±7.53 sec)과 비교하여 유의적으로 감소하였다(Fig. 4A). 하지만 EJE를 투여한 EJE 200 mg/kg 처리군(64.38±7.24 sec)은 scopolamine군과 비교하였을 때, 원통 위에서 머물며 운동하는 시간이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 사물을 쥐는 악력과 운동협응력을 측정하기 위해 수행한 vertical pole test에서도 마찬가지로 scopolamine군(4.53±0.91 sec)의 경우, 기울어진 봉 위에서 버티는 시간이 control군

(6.42±0.83 sec)과 비교하여 유의적으로 감소하였으며, EJE를 투여한 EJE 200 mg/kg 처리군(6.21±0.74 sec)은 유의적으로 시간이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 그리고 water maze test 중 측정된 수영속도 또한 운동능력의 지표로 사용되었으며, scopolamine군(28.54±4.25 cm/sec)의 경우 control군(38.34±3.25 cm/sec)과 비교하여 수영속도가 감소하였으며, EJE 200 mg/kg 처리군(36.31±3.41 cm/sec)의 경우 scopolamine군과 비교하여 수영속도가 유의적으로 증가하였음을 확인하였다(Fig. 4C).

대부분 AD의 발병은 운동능력의 저하를 동반하며, 이와 비슷하게 scopolamine을 투여한 기억력 감퇴 동물모델에서도 균형감각과 협응능력 등과 같은 운동능력들의 저하 현상이 학계에 보고되었다(26,27). 실험동물들이 회전하는 원통 위에서 균형을 잡아야만 하는 rotarod test는 퇴행성 뇌

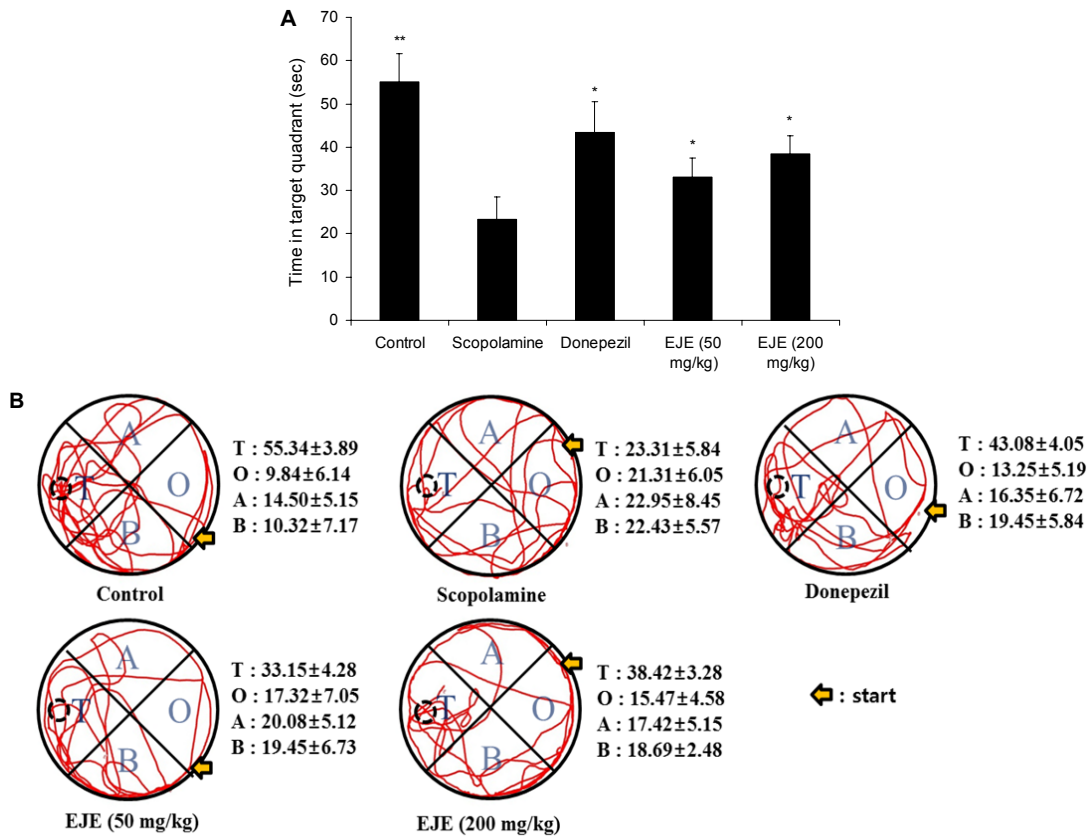


Fig. 2. Effects of *E. japonica* extract (EJE) on scopolamine-induced impairment of memory acquisition and retention in probe trials. (A) The effects of EJE on probe trial sessions of the Morris water maze test. The cumulative time in the target quadrant of the pool in the 90 sec probe trial is shown. (B) Swimming patterns on probe trial sessions of the Morris water maze test. Data are expressed as the mean±SD (n=7). ***P*<0.01, **P*<0.05, significantly different from the scopolamine-treated group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test. Scopolamin, scopolamine-injection group; Donepezil, scopolamine-injection plus donepezil-administered group; 50 mg/kg, scopolamine-injection plus 50 mg/kg b.w. of EJE-administered group; 200 mg/kg, scopolamine-injection plus 200 mg/kg b.w. of EJE-administered group.

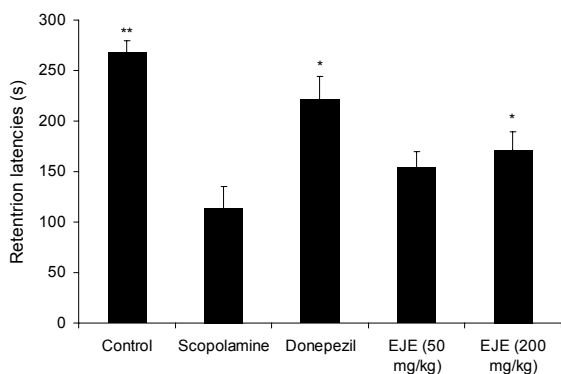


Fig. 3. Effects of *E. japonica* extract (EJE) on scopolamine-induced impairment of memory acquisition and retention in the passive avoidance test. Data are expressed as the mean±SD (n=7). ***P*<0.01, **P*<0.05, significantly different from the scopolamine-treated group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test. Scopolamin, scopolamine-injection group; Donepezil, scopolamine-injection plus donepezil-administered group; 50 mg/kg, scopolamine-injection plus 50 mg/kg b.w. of EJE-administered group; 200 mg/kg, scopolamine-injection plus 200 mg/kg b.w. of EJE-administered group.

질환 실험동물 모델의 운동능력을 평가하기 위해 널리 수행되어지고 있으며, 운동평가 중에서도 'walking'과 관련된 양질의 data를 얻을 수 있는 대표적 실험 중 하나이다(28). 본 실험에서 정상군인 무처리군과 비교하여 scopolamine만을 투여한 음성대조군은 균형감각 및 운동협응력의 저하를 보이는 반면, EJE를 투여한 실험군에서는 유의적으로 균형감각 및 운동협응력이 음성대조군과 비교하여 회복된 것을 확인할 수 있었다. Vertical pole test는 경사진 봉 위에서 실험동물의 grip strength와 균형감각을 측정하기 위해 수행되어졌으며, rotarod test와 마찬가지로 scopolamine에 의해 저하된 grip strength와 균형감각이 EJE의 투여로 다시 회복된 것을 확인하였다. 또한 water maze test 중 운동능력과 관계된 수영속도의 경우 scopolamine에 의해 감소된 수영속도가 EJE를 투여함으로써 다시 회복되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 운동능력 평가 결과를 바탕으로 EJE를 투여함으로써 scopolamine에 의한 기억력 및 인지 기능 감퇴 실험동물에서의 균형감각 상실, 운동협응력 저하, grip strength와 같은 운동능력들이 다시 회복되는 것을 확인하였다.

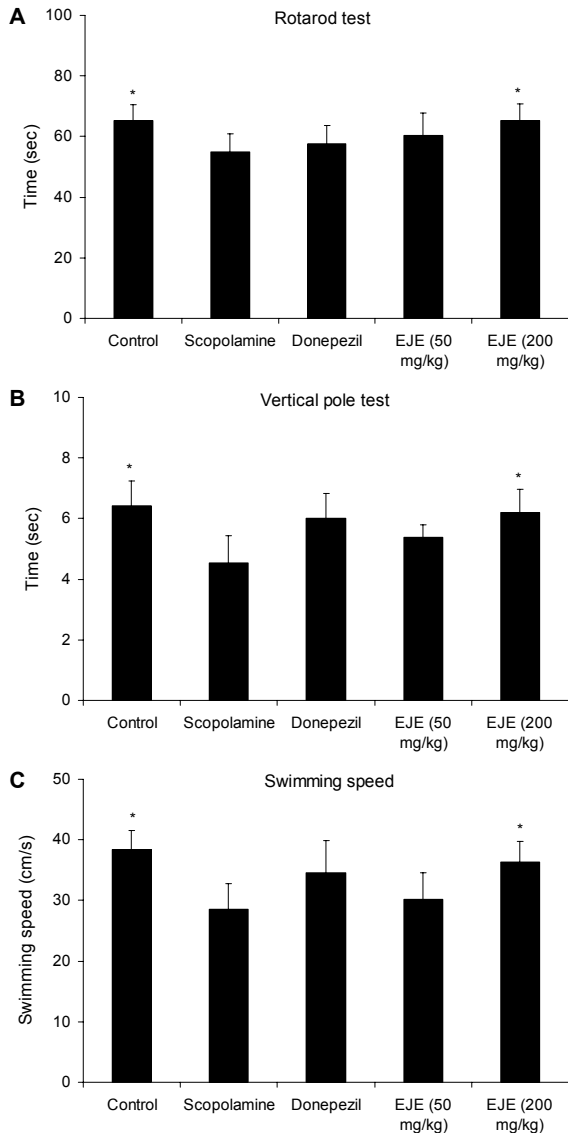


Fig. 4. Effects of *E. japonica* extract (EJE) on scopolamine-induced behavioral deficits. (A) Effects of EJE on scopolamine-induced motor coordination and balance deficits in the rotarod test. (B) Effects of EJE on scopolamine-induced sensorimotor deficits in the vertical pole test. (C) Effects of EJE on scopolamine-induced motor abilities deficits in the swimming speed on Morris water maze test. Data are expressed as the mean±SD (n=7). * $P < 0.05$ significantly different from scopolamine group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test. Scopolamin, scopolamine-injection group; Donepezil, scopolamine-injection plus donepezil-administered group; 50 mg/kg, scopolamine-injection plus 50 mg/kg b.w. of EJE-administered group; 200 mg/kg, scopolamine-injection plus 200 mg/kg b.w. of EJE-administered group.

Scopolamine으로 유도된 동물모델의 뇌 해마에서 Ach 함량과 AchE 활성에 비파엽 추출물의 효과

AchE 활성의 증가와 Ach 함량의 감소는 인지능력 저하와 연관이 있는 것으로 학계에 널리 알려져 왔으며(29), Fig. 5에서 보는 바와 같이 음성대조군인 scopolamine군의 뇌 해마조직에서 Ach의 분해를 촉진시키는 AchE 효소의 활성

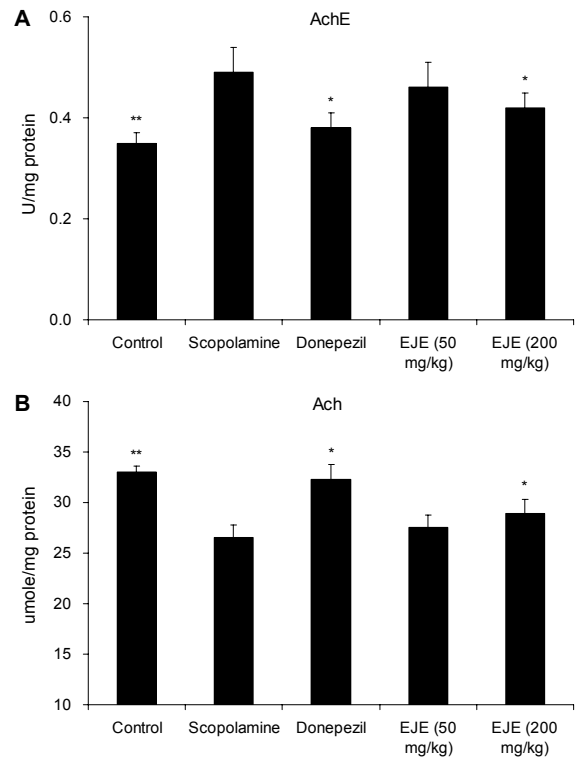


Fig. 5. Effects of *E. japonica* extract (EJE) on AchE activity (A) and Ach content (B) in scopolamine-injected rats. Data are expressed as the mean±SD (n=7). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significantly different from the scopolamine group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test. Scopolamin, scopolamine-injection group; Donepezil, scopolamine-injection plus donepezil-administered group; 50 mg/kg, scopolamine-injection plus 50 mg/kg b.w. of EJE-administered group; 200 mg/kg, scopolamine-injection plus 200 mg/kg b.w. of EJE-administered group.

이 유의적으로 증가하였으며(0.49 ± 0.05 U/mg protein), 그에 따라 뇌 해마조직에서 Ach의 함량은 감소한 것을 확인할 수 있었다(26.58 ± 1.17 μ mole/mg protein). 하지만 EJE를 투여한 EJE 200 mg/kg 처리군의 경우 scopolamine군과 비교하여 AchE의 활성은 유의적으로 감소하였으며(0.42 ± 0.03 U/mg protein), Ach 함량은 증가하였다(28.95 ± 1.38 μ mole/mg protein).

'Cholinergic system'은 뇌의 신경전달물질계에서도 가장 중요한 system 중의 하나로 알려져 있으며 기억, 학습, dendrite arborization, neuronal development 그리고 분화에 있어 중요한 역할을 수행한다(29). Ach는 신경전달물질로서 central nervous system(CNS)과 peripheral nervous system(PNS)에 작용하는 것으로 알려져 있으며, AchE는 Ach를 가수분해함으로써 cholinergic transmission을 저해하고 AD 발병에 있어 인지능력과 관련한 주요한 증상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(30). 본 실험에서 기억력 감퇴와 인지능력 저하를 위해 사용한 scopolamine은 nonselective muscarinic antagonist로 cholinergic signaling을 저해 및 방해하는 역할을 함으로써 age-related

senil CNS dysfunction과 비슷한 인지능력 저하를 유발한다. Cholinergic system의 장애 및 결손은 인지능력의 저하에 큰 영향을 미치며 AD의 진행에도 관련이 있음이 보고되었다(31). 본 연구에서는 scopolamine군과 비교하여 EJE를 투여함으로써 AchE의 활성이 유의적으로 감소하였으며 Ach의 함량이 증가하였다. 이와 같은 연구 결과를 통해 EJE의 anti-amnesic action으로서 cholinergic system에 미치는 영향을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 scopolamine으로 유도한 기억력 및 인지기능 감퇴 동물모델에서 비파엽 추출물의 기억력 및 인지기능 개선 효과를 평가하기 위해 수행되어졌다. 6주령의 SD-rat (male)을 총 5개 군으로 분리하였으며, 양성대조군으로 donepezil(1 mg/kg b.w.)을 처리하였다. 15일간 24시간 간격으로 EJE를 50, 200 mg/kg b.w. 농도로 전처리(경구투여) 하였으며, 16일째에 농도별로 EJE 및 양성대조군으로서 donepezil을 투여하고 scopolamine을 복강투여(1 mg/kg b.w.) 하였다. Water maze test와 passive avoidance test를 통해 scopolamine으로 유도한 동물모델에서 EJE의 기억력 및 인지능력 개선 효과를 확인한 결과, scopolamine에 의해 감소된 기억력 및 학습능력이 EJE를 투여함으로써 유의적으로 회복 및 증가한 것을 확인할 수 있었다. Scopolamine에 의해 인지능력과 함께 감소된 운동능력의 평가를 위해 수행한 rotarod test 및 vertical pole test에서는 scopolamine의 투여로 감소된 균형감각, 협응력 그리고 grip strength와 같은 운동능력들이 EJE의 투여로 유의적으로 회복된 것을 확인하였다. 또한 scopolamine에 의해 증가한 AchE의 활성과 감소한 Ach의 함량이 EJE의 투여로 각각 개선되었다. 본 연구에서는 이와 같은 결과를 바탕으로 EJE의 scopolamine으로 유도한 동물모델에서 인지능력 개선과 감퇴한 운동능력의 향상 및 cholinergic neurotransmission system의 강화 효과를 확인할 수 있었으며, 이러한 연구 성과들로 비파엽 추출물이 퇴행성뇌질환인 AD 치료와 학습 및 기억력 개선에 있어 효과적인 대안으로서 보다 더 많은 분야에서 연구되기를 바라는 바이다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역산업기술개발사업으로 수행된 연구 결과입니다

REFERENCES

- Walsh DM, Selkoe DJ. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer' disease. *Neuron* 44: 181-193.
- Huang HC, Jiang ZF. 2009. Accumulated amyloid- β peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer' disease. *J Alzheimers Dis* 16: 15-27.
- Becker R, Giacobini E, Elble R, McIlhany M, Sherman K. 1988. Potential pharmacotherapy of Alzheimer disease. A comparison of various forms of physostigmine administration. *Acta Neurol Scand Suppl* 116: 19-32.
- Rockwood K. 2011. Biomarkers to measure treatment effects in Alzheimer' disease: what should we look for? *Int J Alzheimer's Dis* doi: 10.4061/2011/598175.
- Alikatte KL, Akondi BR, Yerragunta VG, Verragunta PR, Palle S. 2012. Anti-amnesic activity of *Syzygium cumini* against scopolamine induced spatial memory impairments in rats. *Brain Dev* 34: 844-851.
- Oh JH, Choi BJ, Chang MS, Park SK. 2009. *Nelumbo nucifera* semen extract improves memory in rats with scopolamine-induced amnesia through the induction of choline acetyltransferase expression. *Neurosci Lett* 461: 41-44.
- Haycock JW, Gold PE, Macri J, McGaugh JL. 1973. Non-contingent footshock attenuation of retrograde amnesia: a generalization effect. *Physiol Behav* 11: 99-102.
- Ghoneim MM, Mewaldt SP. 1977. Studies on human memory: the interactions of diazepam, scopolamine, and physostigmine. *Psychopharmacology (Berl)* 52: 1-6.
- Shih CC, Lin CH, Wu JB. 2010. *Eriobotrya japonica* improves hyperlipidemia and reverses insulin resistance in high-fat-fed mice. *Phytother Res* 24: 1769-1780.
- Lee CH, Wu SL, Chen JC, Li CC, Lo HY, Cheng WY, Lin JG, Chang YH, Hsiang CY, Ho TY. 2007. *Eriobotrya japonica* leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme production via the nuclear factor-kappaB signaling pathway in lung epithelial cells. *Am J Chin Med* 36: 1185-1198.
- Namba T. 1994. *The encyclopedia of Wakan-Yaku (traditional Sino-Japanese medicines) with color pictures*. Hoikusha Publishing Co., Osaka, Japan. Vol 2, p 80-82.
- Zhu YP. 1998. *Chinese materia medica*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands. p 508-509.
- De Tommasi N, De Simone F, Cirino G, Cicala C, Pizza C. 1991. Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Planta Med* 57: 414-416.
- Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, Li SH, Hatano T, Sakagami H, Kusama K, Satoh K, Sugita D, Shimura S, Itoh Y, Yoshida T. 2000. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48: 687-693.
- Shimizu M, Fukumura H, Tsuji H, Tanaami S, Hayashi T, Morita N. 1986. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* LINDL. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34: 2614-2617.
- Kim MJ, Lee J, Seong AR, Lee YH, Kim YJ, Baek HY, Kim YJ, Jun WJ, Yoon HG. 2011. Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food Chem Toxicol* 49: 780-784.
- Morris R. 1984. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
- Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Kim YJ, Yoon HG, Shin DH. 2008. Zeatin supplement improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 577-581.
- Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. 1985.

- A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 50: 435-441.
20. Vincent D, Segonzac G, Vincent MC. 1958. Colorimetric determination of acetylcholine by the Hestrin hydroxylamine reaction and its application in pharmacy. *Ann Pharm Fr* 16: 179-185.
 21. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
 22. Barnes CA, Danysz W, Parsons CG. 1996. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur J Neurosci* 8: 565-571.
 23. Blokland A. 2005. Scopolamine-induced deficits in cognitive performance: a review of animal studies. *Scopolamine Rev* 1-76.
 24. Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E. 2003. Effects of beta-casomorphin-5 on passive avoidance response in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2501-2504.
 25. LeDoux JE. 1993. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 58: 69-79.
 26. Poorheidari G, Stanhope KJ, Pratt JA. 1998. Effects of the potassium channel blockers, apamin and 4-aminopyridine, on scopolamine-induced deficits in the delayed matching to position task in rats: a comparison with the cholinesterase inhibitor E2020. *Psychopharmacology (Berl)* 135: 242-255.
 27. Stanhope KJ, McLenachan A, Dourish CT. 1995. Dissociation between cognitive and motor/motivational deficits in the delayed matching to position test: effects of scopolamine, 8-OH-DPAT and EAA antagonists. *Psychopharmacology* 122: 268-280.
 28. Whishaw IQ, Li K, Whishw PA, Gorny B, Metz GA. 2008. Use of rotarod as a method for the qualitative analysis of walking in rat. *J Vis Exp* 22: 1030.
 29. Davies P, Maloney AJF. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer' disease. *Lancet* 2: 1403.
 30. Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2: 307-338.
 31. Bartus RT. 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163: 495-529.